

BEST AVAILABLE COPY

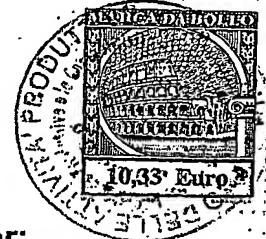
MODULARIO
L.C.A. - 101

Mod. C.E. - 1-4-7



Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi
Ufficio G2



Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: **Invenzione Industriale**

N. RM2002 A 000119

REC'D 30 APR 2003

WIPO PCT

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

Con esclusione, su espressa richiesta del richiedente, di n. 2 pagine del riassunto, regolarmente depositato.

4 MAR. 2003

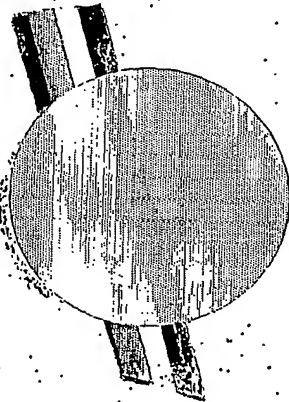
Roma, Il

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

IL DIRIGENTE

[Signature]
D.ssa Paola DI CINTIO



FOGLIO AGGIUNTIVO n. 01

di totali 01

DOMANDA N. _____ Reg. A

N.G.

A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione	_____
Residenza	_____ codice _____
Denominazione	_____
Residenza	_____ codice _____
Denominazione	_____
Residenza	_____ codice _____
Denominazione	_____
Residenza	_____ codice _____
Denominazione	_____
Residenza	_____ codice _____
Denominazione	_____
Residenza	_____ codice _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

05 TUCCI Marina

F. PRIORITA'

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

_____	_____	_____	____/____/____	____/____
_____	_____	_____	____/____/____	____/____
_____	_____	_____	____/____/____	____/____
_____	_____	_____	____/____/____	____/____
_____	_____	_____	____/____/____	____/____
_____	_____	_____	____/____/____	____/____

____/____/____	____/____/____	____/____/____	____/____/____	____/____/____
____/____/____	____/____/____	____/____/____	____/____/____	____/____/____
____/____/____	____/____/____	____/____/____	____/____/____	____/____/____
____/____/____	____/____/____	____/____/____	____/____/____	____/____/____
____/____/____	____/____/____	____/____/____	____/____/____	____/____/____
____/____/____	____/____/____	____/____/____	____/____/____	____/____/____

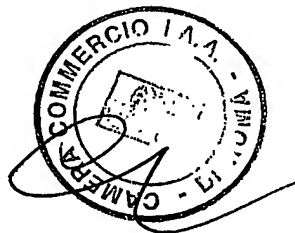
FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

GERMINARIO C.

(Iscr. Albo n. 9898)

Claudio Germinario

SPAZIO RISERVATO ALL'UFFICIO CENTRALE BREVETTI



RM 2002 A 000119

SIB BI3222R

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:
"COMPOSIZIONI CONTENENTI PLGF AD USO FARMACEUTICO E
COSMETICO"

a nome di Geymonat S.p.A
di Anagni (Frosinone)

DESCRIZIONE

Campo dell'invenzione

La presente invenzione riguarda la preparazione di composizioni terapeutiche e cosmetiche capaci di incrementare l'angiogenesi del tessuto connettivo cutaneo, sottocutaneo e d'organi interni, contenenti il Fattore di Crescita Placentare (PLGF). Tali composizioni sono dunque idonee al trattamento di stati patologici o naturali per i quali risulta benefica la formazione o rigenerazione di nuovi vasi del distretto cutaneo quali la sclerodermia, nelle sue varie manifestazioni, l'invecchiamento della pelle o la caduta dei capelli.

Stato della Tecnica

Il Fattore di Crescita d'origine placentare (PLGF) è una glicoproteina omodimerica ad azione regolatrice dell'angiogenesi. La sequenza



S.I.B.
ROMA

polinucleotidica completa codificante la proteina PLGF è stata descritta da Maglione e Persico nel Brevetto EP-B-0 550 519 (WO-A-92/06194). Processi alternativi di "splicing" dell'ARN del PLGF generano tre forme omologhe, precisamente PLGF-1, PLGF-2 e PLGF-3, aventi sequenze polipeptidiche differenti, e tutte descritte in letteratura.

Applicazioni terapeutiche del PLGF-1 sono descritte o semplicemente ipotizzate nello stato dell'arte. Il brevetto EP-B-0550519 ipotizza l'uso del PLGF nel trattamento di generici stati infiammatori, nel trattamento delle ferite, ustioni, ulcere e delle fasi postoperatorie. La domanda internazionale WO-A-01/56593 descrive l'uso parenterale sistemico dei fattori VEGF e PLGF nel trattamento e nella prevenzione dell'ischemia cerebrale, miocardica e periferica. L'articolo scientifico pubblicato su "Il Farmaco", Vol. 55, (2000), pagine 165-167 (Maglione et al.) descrive anch'esso l'effetto di prevenzione del PLGF-1 sull'ischemia miocardica e di riduzione dell'entità dell'infarto. Infine Faille et al. in "Journal Invest. Dermatol.", 115(3), Settembre 2000, pagine 388-395, riportano che la produzione di PLGF è indotta in cheratociti coinvolti nei processi di

riparazione dei tessuti a seguito di ferite. L'insegnamento tecnico anteriore non permette tuttavia di concludere che il PLGF-1 sia efficace nel trattamento preventivo o curativo di malattie o alterazioni patologiche riguardanti il tessuto connettivo cutaneo, sottocutaneo o d'organi interni. In particolare l'insegnamento anteriore non permette di concludere che la somministrazione locale di PLGF esogeno sia in grado di influenzare in vivo la vascolarizzazione cutanea in relazione tanto a stati patologici, quanto a situazioni naturali. Un effetto di promozione dell'angiogenesi a seguito della somministrazione di PLGF esogeno, ed in particolare di promozione della vascolarizzazione cutanea, come ottenuto in accordo con la presente invenzione, risulta particolarmente vantaggioso nel trattamento di stati patologici o fisiologici suscettibili di miglioramento a seguito di una più efficiente irrorazione sanguigna.

Sommario dell'invenzione

L'invenzione si basa sull'inattesa scoperta che un aumento dei livelli di PLGF-1 nei tessuti che compongono la cute, ed in particolare nel tessuto connettivo, è accompagnato da aumento della vascolarizzazione cutanea. E' stato altresì

osservato che tale aumento dei livelli di PLGF-1 tessutali può essere vantaggiosamente raggiunto per somministrazione di PLGF-1 esogeno utilizzando le composizioni parenterali o topiche in accordo con la presente invenzione. La stimolazione dell'angiogenesi si è rivelata utile nel trattamento di patologie tipiche del tessuto connettivo cutaneo, sottocutaneo e d'organi interni, quali la sclerodermia, nelle sue differenti manifestazioni di sclerodermia circoscritta, sclerodermia sistemica progressiva e sclerosi sistemica, la riparazione di lesioni cutanee ed ulcerazioni, la calvizie tanto d'origine naturale che patologica o semplicemente di situazioni fisiologiche quali l'invecchiamento della pelle, specificamente dovuto ad esposizione solare o ad agenti atmosferici/ambientali aggressivi.

Oggetto della presente domanda è l'uso del PLGF, in particolare di PLGF tipo 1, per la preparazione di composizioni terapeutiche o cosmetiche per la promozione dell'angiogenesi nel trattamento preventivo o curativo di malattie o alterazioni naturali o patologiche riguardanti il

tessuto connettivo cutaneo, sottocutaneo o d'organi interni e/o il sistema vascolare.

Specificamente, è oggetto della presente invenzione l'uso di PLGF-1, per la preparazione di composizioni terapeutiche per il trattamento della sclerodermia, in particolare della sclerodermia circoscritta, della sclerodermia sistemica progressiva, della sclerosi sistemica, dell'invecchiamento patologico della pelle dovuto ad esposizione ad agenti aggressivi atmosferici/ambientali o ad irradiazione solare e della calvizie d'origine patologica.

Ulteriore oggetto dell'invenzione è l'uso di PLGF-1 nel trattamento cosmetico preventivo e curativo della caduta di capelli e dell'invecchiamento della pelle.

Sono altresì oggetto dell'invenzione composizioni farmaceutiche per uso topico e parenterale, così come composizioni cosmetiche per uso locale comprendenti PLGF-1 ed eccipienti usuali nel campo delle composizioni farmaceutiche e cosmetiche.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

L'aumento dei livelli di PLGF-1 nei tessuti che compongono la pelle, ed in particolare nei



S.I.B.
ROMA

cheratinociti, è accompagnato da aumento locale della vascolarizzazione. Tale aumento dei livelli di PLGF-1 nei tessuti può essere raggiunto per somministrazione tanto sistemica che locale di PLGF-1 esogeno.

Saggi

L'azione angiogenica del PLGF-1 è stata determinata con metodi noti eseguiti in vivo o in vitro, quali il saggio di vascolarizzazione della cornea di coniglio o di vascolarizzazione della membrana corionallantoidea di pollo. In accordo con la presente invenzione, la vascolarizzazione cutanea è stata esaminata attraverso analisi computerizzata morfometrica di campioni di pelle come descritto da Streit et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, Dicembre 21, 96(26), pagine 14888-14893). Sezioni di pelle isolate da animali da laboratorio, trattati o non trattati secondo la presente invenzione, sono state colorate immunohistochimicamente usando anticorpi monoclonali anti-CD31 dell'animale usato. Le sezioni così trattate sono state analizzate per microscopia elettronica, e l'analisi morfometrica dei tessuti è stata eseguita usando il programma IP-LAB (Scanalytics Inc.). Il numero di vasi sanguigni per mm², le loro

dimensioni medie e l'area relativa da essi occupata sono state determinate come descritto da Streit et al.

Il trattamento locale con PLGF-1 esogeno ha provocato in animali trattati un incremento significativo dei parametri vascolari considerati come illustrato negli esempi.

Un secondo metodo utilizzato per valutare l'attività angiogenica delle composizioni secondo l'invenzione è la capillaroscopia e capillarometria microscopica in vivo. Tale tecnologia nota prevede l'osservazione microscopica diretta della cute preferibilmente pre-trattata con sostanze che ne aumentino la trasparenza, quali la vaselina o oli vegetali. La zona preferita d'analisi è il vallo ungueale delle dita degli arti. L'analisi dei dati ottenuti per capillaroscopia e capillarometria può essere opportunamente effettuata utilizzando sistemi di registrazione fotografica e sistemi computerizzati di rielaborazione dei dati. I parametri considerati sono la morfologia vasale, la morfologia dei tessuti perivasali e l'aspetto reologico. L'osservazione morfologica registra ogni aumento o diminuzione della vascolarizzazione, il calibro dei capillari e la densità capillare per

mm2. L'osservazione dei tessuti valuta la trasparenza del connettivo, la presenza d'emorragia o di depositi lipidici o di collagene sclerotizzato contornante i vasi capillari. In particolare l'osservazione del connettivo perivasale evidenzia, in condizioni normali, l'ansa capillare contornata da un alone più chiaro che prende il nome di halo capillare, costituito da tessuto lasso ricco di glucosaminoglicani. La scomparsa o diminuzione di tale alone è segno di profonda alterazione strutturale del connettivo. Altri tipi d'alterazione sono la diminuita trasparenza tissutale che accompagna la sclerodermia. L'aspetto reologico valuta la velocità di flusso o la presenza d'aggregati eritrocitari o di trombosi. L'attività delle composizioni dell'invenzione nel trattamento della sclerodermia è stata valutata su modello animale come descritto da Yamamoto T. et al. in Arch. Dermatol. Res. Nov. 2000, 292(11), pagine 535 a 541. Uno stato di sclerodermia è indotto in topi C3H attraverso trattamento con bleomicina (100 mcg/ml) iniettata giornalmente sottocute per 3 settimane. Trascorse 3 settimane, gli animali sono sacrificati e campioni di pelle delle zone trattate sono sottoposti ad analisi

istologica. L'effetto del trattamento evidenzia manifestazioni istologiche attribuibili alla sclerotizzazione cutanea indotta dalla bleomicina, ed in particolare ispessimento cutaneo e livelli d'idrossiprolina elevati.

PLGF

Il Fattore di Crescita Placentare tipo 1 (PLGF-1) usato nella presente invenzione può essere d'origine estrattiva, oppure ottenuto come prodotto d'espressione da cellule ospiti geneticamente modificate. Nella forma di realizzazione preferita dell'invenzione, si utilizza un fattore altamente purificato in forma essenzialmente omodimerica o multimerica ottenuto in accordo col metodo descritto dai presenti inventori nella domanda internazionale PCT/IT 02/00065. In particolare si utilizza un prodotto contenente non meno del 98,5% di forme attive dimerica e multimerica, non meno del 70% di forma dimerica ed in ogni caso non più del 1,5% di forma monomerica. Frammenti funzionalmente attivi del PLGF-1 possono ugualmente essere utilizzati nell'ambito dell'invenzione. Frammenti che presentino almeno il 30% dell'attività specifica del fattore purificato, o preferibilmente almeno il 50% o meglio almeno 90%



S.I.B.
ROMA

della stessa attività possono essere considerati funzionalmente equivalenti al fattore naturale.

Malattie

Il trattamento della sclerodermia è un aspetto dell'invenzione, rispettivamente delle composizioni dell'invenzione.

E' questa una malattia che coinvolge il sistema microvascolare ed il tessuto connettivo cutaneo, sottocutaneo e d'organi interni. La malattia induce l'attivazione dei fibroblasti ed un'eccessiva produzione e deposito tessutale e perivasale di collagene, che contribuisce pesantemente alla formazione di fibrosi e zone di calcificazione, e quindi alla manifestazione dei sintomi indotti dalla malattia. In particolare si osserva in capillaroscopia che grandi quantità di collagene sclerotizzato contornano i vasi cutanei causando restringimento del lume vasale.

Si distinguono una sclerodermia circoscritta con interessamento cutaneo, caratterizzata da indurimento ed ispessimento della pelle per eccessive ed inadeguata deposizione di collagene, ed una sclerodermia sistemica progressiva in cui, alla fibrosi cutanea, si associano un coinvolgimento dei vasi sanguigni e una sclerosi

sistemica con lesioni viscerali. La cute, soprattutto delle dita e delle mani si presenta indurita, ispessita e edematosa. La malattia si manifesta inoltre a livello miocardico con insufficienza cardiaca, a livello polmonare, gastrointestinale, renale, e di sistema osteo-muscolare. Alcuni pazienti sviluppano inoltre artropatie erosive indotte da fibrosi cutanea che complicano enormemente la mobilità delle articolazioni.

E' stato riportato in relazione ad altri farmaci angiogenetici, che la promozione d'angiogenesi, in particolare cutanea, dovuta al trattamento con detti farmaci, causa un benefico effetto sul quadro clinico della malattia. In particolare, l'analisi capillaroscopica in vivo di superfici di pelle di pazienti affetti da sclerosi sistemica e trattati con fattori angiogenetici ha dimostrato un aumento statisticamente significativo della vascolarizzazione, sia come densità sia come calibro medio vasale. Inoltre i nuovi vasi sono liberi da collagene sclerotizzato e quindi in grado di migliorare l'irrorazione del tessuto. Quest'aumento è accompagnato da parziale remissione delle manifestazioni patologiche.

Pur senza voler legare o limitare l'invenzione a teorie scientifiche, s'ipotizza che l'effetto terapeutico esercitato dal PLGF-1 su modello animale, nel trattamento della sclerosi sistemica, sia mediato dall'azione vasodilatatrice che accompagna l'angiogenesi in vivo. E' stato infatti dimostrato che uno degli effetti provocati dal PLGF-1 è quello di stimolare la formazione d'ossido d'azoto (NO), che molte evidenze scientifiche indicano come importante mediatore della vasodilatazione.

Il meccanismo d'azione presumibilmente alla base dell'effetto prodotto dal PLGF-1 nel trattamento della sclerodermia e delle sue manifestazioni collaterali, appare in accordo con il trattamento terapeutico odierno di queste patologie. Tale trattamento si basa, infatti, sull'uso combinato di diversi tipi di medicinali tra i quali agenti ad azione vascolare e principalmente vasodilatatrice.

Un secondo aspetto dell'invenzione riguarda il trattamento dei fenomeni tipici dell'invecchiamento della pelle. Tale trattamento, se pur considerato essenzialmente cosmetico, presenta implicazioni terapeutiche quando si considerino i fenomeni di

deterioramento precoce dei tessuti cutanei dovuti ad esposizione prolungata all'irradiazione solare (foto-invecchiamento), a radiazioni d'altro tipo o ad agenti ambientali/atmosferici aggressivi.

La microscopia elettronica di campioni di pelle foto-danneggiata rivela una morfologia microvascolare tipica caratterizzata, tra altre manifestazioni, dalla presenza di capillari patologicamente dilatati ed avvolti da elastina o circondati da un materiale amorfo denso. Si osserva anche la presenza di cellule endoteliali attivate recanti un aumentato numero d'organelli citoplasmatici e di vescicole di pinocitosi. Si è osservato che la stimolazione di nuova vascolarizzazione cutanea causata dalla somministrazione di PLGF-1, in accordo con l'invenzione, genera nella pelle tanto naturalmente che precocemente invecchiata un effetto di modulazione sulla matrice extra cellulare responsabile del tono e dello spessore della pelle. L'aumentata vascolarizzazione capillare a seguito di trattamento locale prolungato con le composizioni dell'invenzione è accompagnata dall'aumento di fibroblasti e della produzione di



S.I.R.
ROMA

nuovo collagene, seguito da miglioramento generale dell'apparenza della pelle.

Un altro aspetto dell'invenzione riguarda la caduta del capello.

La migliorata vascolarizzazione cutanea è accompagnata da un'ulteriore manifestazione d'importanza sia terapeutica sia cosmetica, vale a dire la modulazione della crescita degli annessi cutanei (capelli, peli, etc.) intesa come prevenzione della caduta e promozione della rigenerazione.

La fase anagenica, che corrisponde alla fase di crescita del capello è accompagnata da un naturale aumento della vascolarizzazione del follicolo capillare. L'azione angiogenica del PLGF-1 applicato a livello locale promuove tale incremento vascolare e la conseguente crescita del capello. L'analisi morfometrica computerizzata di sezioni di pelle prossime al follicolo pilifero d'animali trattati con le composizioni dell'invenzione ha rivelato non soltanto un aumento delle dimensioni del lume capillare e della densità capillare, dunque un aumento generale della vascolarizzazione perifollicolare, ma altresì un

aumento delle dimensioni del bulbo pilifero e del diametro del pelo stesso.

L'effetto di prevenzione della caduta del capello o di promozione della sua ricrescita trova applicazione, non solo in caso di perdita naturale, ma anche in caso di perdita a seguito di stati clinicamente rilevanti come alopecia, disordini ormonali, chemioterapia, radioterapia o somministrazione di medicinali.

Qualsiasi formulazione idonea alla somministrazione sistemica o locale di agenti terapeutici può essere utilizzata in accordo con l'invenzione. Formulazioni per uso locale sono utilizzate nell'ambito d'applicazioni cosmetiche.

In particolare, il fattore PLGF-1 può essere somministrato per via parenterale con effetto sistemico o locale o per via topica su cute o mucose con effetto principalmente locale. Un effetto sistemico è ottenuto principalmente attraverso somministrazione endovenosa, benché sia possibile anche la somministrazione intraperitoneale o intramuscolare. Un effetto locale è ottenuto attraverso somministrazione topica, o parenterale intramuscolare, sottocutanea, intrarticolare. Il fattore PLGF-1 può altresì

essere somministrato a livello locale per elettrotrasporto o iontoforesi. Impianti sottocutanei sono altresì utilizzabili quando si desidera ottenere un rilascio ritardato nel tempo. La somministrazione orale del fattore, benché anch'essa possibile, è meno consigliabile in considerazione della delicatezza del prodotto attivo.

Composizioni per uso parenterale sistemico o locale includono soluzioni, sospensioni, sospensioni liposomali, emulsioni W/O o O/W. Composizioni per uso topico includono soluzioni, lozioni, sospensioni, sospensioni liposomali, emulsioni W/O o O/W, gel, unguenti, creme, pomate e paste. In una forma di realizzazione preferita la sostanza attiva è formulata in forma liofilizzata, miscelata ad idonei additivi di liofilizzazione e pronta per essere riportata in soluzione con diluenti terapeuticamente accettabili. Additivi di liofilizzazione utilizzabili sono: tamponi, polisaccaridi, saccarosio, mannitolo, inositolo, polipeptidi, amino acidi ed ogni altro additivo compatibile con la sostanza attiva. In una forma di realizzazione preferita dell'invenzione, la sostanza attiva è dissolta in tampone fosfato

($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_2\text{O}$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4/2\text{H}_2\text{O}$) in quantità tale che il rapporto PLGF1/fosfato dopo liofilizzazione sia compreso tra 1:1 e 1:2. Diluenti idonei per uso parenterale sono: acqua, soluzioni fisiologiche, soluzioni di zuccheri, soluzioni idro-alcoliche, diluenti oleosi, polioli, quali glicerolo, etilene o polipropilene glicol, o ogni altro diluente compatibile col metodo di somministrazione quanto a sterilità, pH, forza ionica e viscosità.

Nel caso d'emulsioni o sospensioni la composizione può contenere idonei agenti tensioattivi di tipo non ionico, zwitterionico, anionico o cationico d'uso comune nella formulazione di medicinali. Emulsioni idrofiliche olio in acqua (O/W) sono preferibili per uso parenterale, sistemico mentre emulsioni lipofiliche acqua in olio (W/O) sono preferibili per uso locale o topico.

Inoltre, le composizioni dell'invenzione possono contenere additivi opzionali quali agenti isotonici, come zuccheri o polialcoli, tamponi, agenti chelanti, antiossidanti, antibatterici.

Le composizioni ad uso topico includono forme liquide o semisolide. Le prime comprendono soluzioni o lozioni. Queste possono essere acquose,



S.I.R.
ROMA

idro-alcoliche, quali etanolo/acqua o alcoliche e sono ottenute per solubilizzazione della sostanza liofilizzata.

Alternativamente, soluzioni di sostanza attiva possono essere formulate in forma di gel per addizione di noti agenti gelificanti quali: amido, glicerina, polietilene o polipropilene glicol, poli(meta) acrilato, isopropil alcol, idrossistearato.

Altri tipi di composizioni per uso topico sono, emulsioni o sospensioni in forma di pomate paste, creme. Emulsioni W/O sono preferite offrendo un più veloce assorbimento. Esempi d'eccipienti lipofili sono: paraffina liquida, lanolina anidra, vaselina bianca, alcol cetilico, alcol stearilico, olii vegetali, olii minerali. Agenti che aumentino la permeabilità cutanea, facilitando così l'assorbimento possono essere vantaggiosamente utilizzati. Esempi di tali agenti sono additivi fisiologicamente accettabili quali il polivinil alcol, polietilenglicol o il dimetilsolfossido (DMSO).

Altri additivi utilizzati nelle composizioni topiche sono agenti isotonici, come zuccheri o polialcoli, tamponi, agenti chelanti,

antiossidanti, antibatterici, addensanti, disperdenti.

Composizioni ad uso locale o sistemico a rilascio ritardato nel tempo possono ugualmente essere utilizzate e comprendono polimeri quali polilattato, poli(meta)acrilato, polivinilpirrolidone, metilcellulosa carbossimetilcellulosa e altre sostanze note nel settore. Composizioni a rilascio ritardato in forma di impianti sottocutanei a base per esempio di polilattato o d'altri polimeri biodegradabili possono essere altresì utilizzabili.

Benché la sostanza attiva sia preferibilmente confezionata in forma liofilizzata, quindi stabile, le composizioni farmaceutiche comprendono vantaggiosamente sostanze stabilizzanti il PLGF-1 nelle forme attive dimerica-multimerica. Tali stabilizzanti inibiscono la formazione di ponti disolfuro intermolecolari prevenendo così la polimerizzazione della sostanza attiva. Tuttavia, la quantità di stabilizzante deve essere calibrata attentamente per evitare al tempo stesso la riduzione della sostanza attiva alla forma monomerica inattiva. Esempi di tali sostanze sono:

Cisteina, Cisteamina, o glutatione in forma ridotta.

Dosaggio

Il dosaggio dipende dalla via di somministrazione e dalla formulazione scelte. Per somministrazioni parenterali le quantità variano da 1 mcg/Kg/giorno a 500 mcg/Kg/giorno, preferibilmente da 10 mcg/Kg/giorno a 200 mcg/Kg/giorno. Tali somministrazioni sono ottenute con composizioni farmaceutiche comprendenti circa da 50 mcg a 30 mg per dose unitaria, preferibilmente circa da 500 mcg a 10 mg per dose. Per applicazione topica terapeutica le quantità varianti fra 0,1 mg a 10 mg per grammo di composizione si sono dimostrate efficaci. Composizioni locali a scopo cosmetico per il trattamento dell'invecchiamento della pelle o la caduta del capello comprendono preferibilmente da 0,01 mg a 0,09 mg di sostanza attiva per grammo di composizione.

La durata del trattamento varia dipendentemente dalla patologia o dall'effetto desiderato. Nel caso del trattamento della sclerodermia l'applicazione varia da 1 giorno a 12 mesi in relazione alla gravità della patologia. Nel

caso di un trattamento contro l'invecchiamento naturale della pelle o invecchiamento precoce l'applicazione varia da 1 a 400 giorni, preferibilmente per almeno 30 giorni. Nel caso di trattamento di prevenzione della caduta del capello o promozione della ricrescita del capello l'applicazione varia ugualmente da 1 a 400 giorni.

Esempio 1

Soluzione per uso parenterale:

58 milligrammi di sostanza liofilizzata, contenente 25 mg di PLGF-1 pura e 33 mg di tampone fosfato (10 mg di $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_2\text{O}$ e 23 mg di $\text{Na}_2\text{HPO}_4/2\text{H}_2\text{O}$), e circa 125 ml di soluzione fisiologica per uso parenterale, sono confezionati separatamente in flaconi predisposti alla miscelazione del liofilizzato col diluente immediatamente prima dell'uso. La concentrazione di sostanza attiva risultante dopo solubilizzazione è di circa 0,2 mg/ml.

Esempio 2

Emulsione W/O per applicazione topica.

Una quantità di sostanza liofilizzata contenente 20 mg di sostanza attiva è portata in 5 ml soluzione idro-alcolica d'etanolo al 10% contenente 10% di DMSO. La soluzione è emulsionata



S.I.B.
ROMA

in olio vegetale sterile per applicazione cutanea utilizzando un tensioattivo idoneo per emulsioni W/O avente coefficiente HLB inferiore a 10. L'emulsione contiene sostanza attiva pari a circa 2 mg/gr di composizione.

Esempio 3

Emulsione O/W

Una quantità di sostanza liofilizzata contenente circa 20 mg di sostanza attiva è solubilizzata in 5 ml di soluzione idro-alcolica comprendente 30% di DMSO ed emulsionata con idoneo tensioattivo in solvente lipofilo a base d'olio vegetale. L'emulsione O/W risultante contiene la sostanza attiva alla concentrazione di circa 3 mg/gr di composizione.

Esempio 4

Composizione topica in forma di gel.

Una quantità di sostanza liofilizzata contenente 10 mg di sostanza attiva è portata in 20 ml di soluzione idro-alcolica d'etanolo al 10% contenente 20% di DMSO. La soluzione è quindi addizionata con una miscela di polietilene glicole (400-4000) e polipropilene glicole. La sostanza attiva è presente in quantità pari a 0.2 mg/gr

composizione. Il gel è idoneo per applicazione cosmetica.

Esempio 5

4 Topi glabri tipo SKH-1 sono stati trattati giornalmente per 20 giorni con 50 microlitri della soluzione descritta all'esempio 1 (0,2 mg/ml) per via parenterale sottocutanea su una superficie di pelle definita (1 cm²) nella zona dorsale. Altri 4 topi dello stesso tipo sono stati trattati per 30 giorni con la composizione descritta nell'esempio 2 (2 mg/gr) per via topica. 4 Topi dello stesso tipo sono stati trattati con i soli eccipienti per uso parenterale ed altri 4 con i soli eccipienti per uso topico rispettando gli stessi regimi di somministrazione. Campioni di pelle degli animali sacrificati sono stati esaminati attraverso analisi computerizzata morfometrica come descritto da Streit et al. (supra). In dettaglio, sezioni di pelle (5 micron) sono state colorate immunostochimicamente usando anticorpi monoclonali anti-CD31 di topo. Le sezioni così trattate sono state analizzate per microscopia elettronica, e l'analisi morfometrica dei tessuti è stata eseguita usando il programma IP-LAB (Scanalytics Inc.) I parametri considerati sono stati l'area coperta dai vasi (%)

per mm²) e le dimensioni medie dei vasi (µm²). I risultati sono riportati in tabella 1.

Tabella 1

Parametro	Placebo Parenteral e	Placebo Topico	PLGF-1 Parenteral e	PLGF-1 Topico
Area vasi mm ² (%)	4,3±0,2 %	4,1±0,2 %	6,2±0,3%	5,2±0,6%
Dimensione Vasi (µm ²)	180±9	176±9	279±14	235 ±12,7

I valori riportati in tabella mostrano aumenti statisticamente significativi sia in relazione al trattamento parenterale che al trattamento topico, se pur per quest'ultimo l'aumento risulti meno pronunciato.

Esempio 6

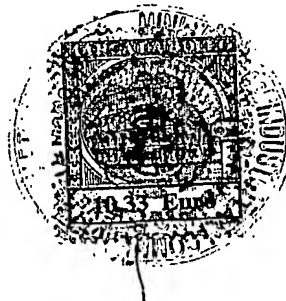
In questo esempio è stato usato il modello animale di scleroderma indotta da bleomicina descritto da Yamamoto et al. (supra).

Un primo gruppo di topi C3H è stato trattato con bleomicina (100 mcg/ml) iniettata giornalmente sottocute per 3 settimane. Altri 3 gruppi di topi

C3H sono stati trattati anch'essi come il precedente, ma nell'iniezione giornaliera è stato aggiunto PlGF-1 a 0.1, 1 e 10 mcg/ml, rispettivamente. Trascorse le 3 settimane di trattamento gli animali sono stati sacrificati e la pelle delle zone trattate è stata prelevata e sottoposta ad analisi istologica. L'effetto del trattamento con PlGF-1 a 1 e 10 mcg/ml, ma non a 0.1 mcg/ml, ha evidenziato una significativa riduzione delle manifestazioni istologiche attribuibili alla sclerotizzazione cutanea indotta dalla bleomicina. In particolare, l'ispessimento cutaneo ed i livelli d'idrossiprolina risultano significativamente diminuiti rispetto ai topi trattati con sola bleomicina.

Esempio 7

Il dorso della mano sinistra di individui adulti sani di età compresa tra 50 e 60 anni normalmente fortemente esposti a fattori aggressivi ambientali e ad irradiazione solare è stato trattato con applicazioni topiche cutanee della composizione in forma di gel descritta all'esempio 4. La quantità applicata è stata di 1 gr di gel, corrispondente a 0.2 mg di sostanza attiva, al giorno per la durata di 60 giorni nel periodo



S.I.R.
ROMA

estivo. L'effetto del trattamento è stato valutato con analisi capillaroscopica e capillarometrica con registrazione e rielaborazione computerizzata dei dati osservati. L'analisi delle superfici non trattate ha evidenziato il quadro tipico del foto-invecchiamento precoce cutaneo, caratterizzato dalla presenza di capillari patologicamente dilatati ed avvolti da elastina o circondati da un materiale amorfo denso.

A livello macroscopico, il trattamento ha prodotto un miglioramento generale del tono e dell'apparenza della pelle.

In particolare, l'analisi capillaroscopica ha rivelato che l'aumento della vascolarizzazione capillare è particolarmente evidente nelle aree perifollicolari pilifere. Il confronto eseguito per capillarometria nell'area perifollicolare di superfici trattate con la composizione in oggetto o di superfici non trattate evidenzia un aumento del numero di vasi rapportato per mm² di circa 35,0%. Essendo noto che un aumento della vascolarizzazione del follicolo pilifero ne stimola la crescita, i dati sopra riportati provano che il trattamento topico con PLGF-1 è efficace non solo contro

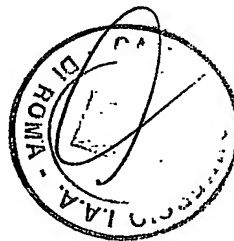
l'invecchiamento della pelle, ma promuove altresì
la crescita capillare/pilifera.

GERMINARIO G.

Industria

(Iscr. Albo n. 989B)

Plumier Germinario



RM 2002 A 000119

RIVENDICAZIONI

1. Uso del Fattore di Crescita Placentare tipo 1 (PLGF-1) per la preparazione di un medicamento promotore dell'angiogenesi nel trattamento preventivo o curativo di malattie o alterazioni patologiche riguardanti il tessuto connettivo cutaneo, sottocutaneo o d'organi interni e/o il sistema vascolare.

1. Uso del Fattore di Crescita Placentare tipo 1 (PLGF-1) secondo la rivendicazione 1 in cui la malattia è la sclerodermia.

1. Uso del Fattore di Crescita Placentare tipo 1 (PLGF-1) secondo le rivendicazioni 1 o 2 in cui la malattia è la sclerodermia circoscritta o la sclerodermia sistemica progressiva.

1. Uso del Fattore di Crescita Placentare tipo 1 (PLGF-1) secondo la rivendicazione 3 in cui la sclerodermia circoscritta è cutanea e la sclerodermia sistemica progressiva è la sclerodermia miocardica.

1. Uso del Fattore di Crescita Placentare tipo 1 (PLGF-1) secondo la rivendicazione 1 in cui l'alterazione patologica è l'invecchiamento precoce della pelle dovuto ad esposizione ad agenti

aggressivi atmosferici o ad irradiazione solare prolungato.

1. Uso del Fattore di Crescita Placentare tipo 1 (PLGF-1) secondo la rivendicazione 1 in cui l'alterazione patologica è la perdita di capelli dovuta ad alopecia, disordini ormonali, chemioterapia, radioterapia o somministrazione di medicinali.

1. Uso del Fattore di Crescita Placentare tipo 1 (PLGF-1) come promotore dell'angiogenesi cutanea o sottocutanea nella prevenzione e nel trattamento cosmetico dell'invecchiamento naturale della pelle.

1. Uso del Fattore di Crescita Placentare tipo 1 (PLGF-1) come promotore dell'angiogenesi perifollicolare nella prevenzione e nel trattamento cosmetico della perdita naturale di capelli.

1. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6 in cui il medicinale è in forma idonea per generare un effetto sistemico o locale.

1. Uso secondo la rivendicazione 9 in cui il medicinale è formulato per la somministrazione parenterale, topica o impianto sottocutaneo.

Uso secondo la rivendicazione 9 in cui l'effetto sistemico è ottenuto per somministrazione intravenosa e l'effetto locale è ottenuto per



somministrazione intra-muscolare, intra-articolare, sottocutanea, topica o per impianto sottocutaneo o iontoforesi.

1. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 7 o 8 in cui il PLGF-1 è formulato in una composizione cosmetica per somministrazione topica.

1. Composizione farmaceutica o cosmetica comprendente PLGF-1 come principio attivo ed un eccipiente farmaceuticamente o cosmeticamente accettabile, caratterizzata dal fatto che almeno il 98,5% del PLGF-1 è in forma attiva dimerica e multimerica, che almeno il 70% è in forma dimerica e che non più di 1,5% è in forma monomerica.

1. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 13 caratterizzata dal fatto che è per uso locale ed in forma di soluzione, lozione, emulsione W/O, emulsione O/W, sospensione, sospensione liposomale, gel, crema, pasta, unguento o impianto sottocutaneo.

1. Composizione cosmetica secondo la rivendicazione 13 caratterizzata dal fatto che è per uso locale ed in forma di soluzione, lozione, emulsione W/O, emulsione O/W, sospensione, sospensione liposomale, gel, unguento, crema o pasta.

15. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 13 a 15 comprendenti uno o più sostanze in grado di stabilizzare il PLGF-1 nelle forme attive dimerica- multimerica.

16. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 13 a 16 comprendente PLGF-1 in quantità idonea per una somministrazione da 1 mcg/Kg/giorno a 500 mcg/Kg/giorno, preferibilmente da 10 mcg/Kg/giorno a 200 mcg/Kg/giorno.

17. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 13 a 16 comprendente PLGF-1 in quantità idonea per una somministrazione da 1 mcg/Kg/giorno a 500 mcg/kg/giorno, preferibilmente da 10 mcg/Kg/giorno a 200 mcg/kg/giorno.

p.p. Geymonat S.p.A

GERMINARIO C

(Iscr. ATbò n. 989B)

Paolo Perini

